

## ヒト子宮内膜再生における肝細胞増殖因子の役割

著者	菅原 準一
号	3189
発行年	2000
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/22051">http://hdl.handle.net/10097/22051</a>

氏 名（本籍）	すが 菅	わら 原	じゅん 準	いち 一
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）			
学 位 記 番 号	医 第 3 1 8 9 号			
学位授与年月日	平 成 12 年 3 月 1 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当			
最 終 学 歴	平 成 元 年 3 月 31 日 東北大学医学部医学科卒業			
学 位 論 文 題 目	Role of Hepatocyte Growth Factor in Regeneration of Human Endometrium. (ヒト子宮内膜再生における肝細胞増殖因子の役割)			
	(主 査)			
論文審査委員	教授 矢 嶋	聡	教授 折 笠 精 一	
	教授 岡 村 州 博			

# 論文内容要旨

## 【目 的】

最近の研究により、種々の細胞成長因子が子宮内膜細胞に働きかけ、月経時や胚着床後の子宮内膜再生に関与していることが明らかになってきている。しかし、そのメカニズムに関しては、いまだ解明されていない。今回の研究は、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor, HGF) が培養子宮内膜上皮細胞に及ぼす生物学的効果を検討し、その子宮内膜再生、修復における役割を考察した。

## 【方法および結果】

良性疾患を対象とする開腹術、または腹腔鏡施行時に得られた増殖期子宮内膜 ( $n=10$ ) を対象とした。子宮内膜は PBS 中にて細切、0.25% コラゲナーゼ処理 60 分後、106m のナイロンメッシュフィルターにて濾過した。次に細胞を DMEM/F12, 10ml 中に懸濁、60 分静置し上皮細胞集塊の豊富な底部 2ml を回収する操作を 2 回繰り返す。さらに 60mm dish に細胞懸濁液を 30 分培養し、残存する子宮内膜間質細胞を付着させ、上皮細胞を回収、純化した。

得られた培養細胞に対し、c-MET, サイトケラチン, ビメンチン, ファクター VIII, CD45 を一次抗体とした間接蛍光抗体法による免疫染色を行い、子宮内膜間質細胞, 血管内皮細胞, 白血球の混入のないこと、および子宮内膜上皮細胞に HGF レセプター (c-MET) が発現することを確認した。さらに得られた子宮内膜上皮細胞から mRNA を抽出、human c-met cDNA からデザインされたオリゴヌクレオチドを用い RT-PCR, southern hybridization を行い上皮細胞に c-met mRNA が発現していることを確認した。

96 穴プレートに培養した細胞 ( $10^4$ /well) に recombinant HGF (SIGMA) 0–100ng/ml を加え 24 時間培養、MTT 法により HGF の子宮内膜上皮細胞の増殖に対する効果を検討したところ、用量依存性に増殖促進効果を認めた。

また細胞運動性に対する効果を Boyden's chamber 法を用い検討した。すなわち 24 穴プレート上のフィルターに細胞 ( $10^5$ /well) を培養し、フィルター下には 0, 50ng/ml の HGF を加え 24 時間培養の後、フィルター上の細胞を除去し、フィルター下の細胞を染色、イメージアナライザーにて細胞数を計測した。この実験により HGF 50ng/ml 添加にて運動細胞数は ( $185.43 \pm 31.2$  vs  $468.1 \pm 54.55$ ;  $p < 0.05$ ) と有意に上昇した。

さらに我々は、Matrigel (Becton Dickinson) を用いた 3 次元培養系にて内膜上皮細胞の管腔形成誘導作用に対する影響を検討した。細胞 ( $10^5$ /well) を Matrigel と混和し、ゲル化させ

たのちに 0, 50ng/ml HGF を添加し, 3 週間培養した。管腔形成をしている細胞集塊の割合を無作為に選んだ 3 視野にて光顕下にて計測した。またゲルを固定しパラフィン包埋, 1m に薄切, HE 染色にて組織学的検討を加えた。子宮内膜上皮細胞を Matrigel 内で培養すると, まず細胞集塊を形成し, 次第に管腔を形成する。3 週間培養の後, HGF 50ng/ml 添加群では有意に管腔形成が促進されていた ( $14 \pm 0.8\%$  vs  $42.95 \pm 2.95\%$ ;  $p < 0.05$ )。また, 管腔形成した細胞塊を組織学的に検討したところ, 典型的な上皮細胞としての性格が確認された。

## 【結 論】

今回の研究により, 肝細胞増殖因子が培養子宮内膜上皮細胞の増殖, 運動性, および形態形成を刺激することが初めて明らかにされ, また月経時やヒト胚着床時の子宮内膜再生過程に肝細胞増殖因子が重要な意義を持つことが示唆された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

月経時や胚着床後の子宮内膜再生過程に、種々の細胞成長因子が関与していることが解明されてきている。しかし、その詳細なメカニズムに関してはいまだ明らかにされていない。肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor, HGF) は、ラット肝細胞の強力な増殖因子とされていたが、その後の研究により広く間葉系の細胞から分泌され、上皮系細胞に働き様々な臓器の再生、再構築に重要な役割を果たしていることが明らかにされ、注目されている。本研究では、肝細胞増殖因子が培養子宮内膜上皮細胞に及ぼす生物学的効果を検討し、その子宮内膜再生、修復における役割を考察した。

ヒト子宮内膜上皮細胞の純化、培養は以下のように行った。すなわち良性疾患を対象とする開腹術、または腹腔鏡施行時に得られた増殖期子宮内膜 (n=10) を、コラゲナーゼ処理、ナイロンメッシュフィルターにて濾過後、残存する子宮内膜間質細胞から上皮細胞を分離、形態学的に上皮細胞であることを確認した。さらに、得られた培養上皮細胞に対し、種々のマーカーを用い間接蛍光抗体法による免疫染色を行い、子宮内膜間質細胞、血管内皮細胞、白血球の混入のない純化された内膜上皮細胞であることを明確にした。

次いで、抗 HGF レセプター (c-MET) 抗体を用いた免疫染色、および human c-met gene からデザインされた RT-PCR, southern hybridization を行い、培養上皮細胞に HGF レセプターである c-met mRNA, および protein が発現していることを明らかにしている。

引き続き、HGF の上皮細胞への生物学的効果、すなわち増殖、運動性、形態形成に対する影響を検討した。recombinant HGF 添加実験では、用量依存性の細胞増殖促進効果を示し、Boyden's chamber 法を用いた細胞運動性に対する効果については、イメージアナライザーにて運動細胞数を計測し、HGF 添加にて有意に上昇することが明らかになった。また、Matrigel を用いた 3 次元培養系を確立し、内膜上皮細胞が細胞集塊を形成し、次第に管腔を形成することを初めて明らかにし、加えて HGF 添加による管腔形成誘導作用を証明した。

以上より、本研究は肝細胞増殖因子が培養子宮内膜上皮細胞の増殖、運動性、および形態形成を刺激することを初めて解明し、肝細胞増殖因子がヒト子宮内膜の再生に深く関与することを示唆するものであり、医学博士の学位論文に充分値するものと考えられる。